

19. 病原体ゲノム解析研究センター

センター長 黒田 誠

概要

病原体ゲノム解析研究センターは、ウイルス感染症の発症に係わる宿主遺伝子の探索・解析を行う第一室、病原性ウイルスのゲノム解析を行う第二室、病原性細菌のゲノム解析を行う第三室から構成されている。

第一室では、主に子宮頸癌の原因となるヒトパピローマウイルス(HPV)の増殖とそれを支える細胞因子の研究および HPV による発癌メカニズムの解析、ならびに HPV 感染実態の疫学調査を行った。HPV は表皮や粘膜の微小な傷から侵入し、上皮基底細胞の核内にエピゾームとして潜伏・持続感染する。感染細胞が分化し表皮形成に至る過程でウイルスの増殖が起こるが、この生活環を支える分子機構は不明である。抗 HPV 薬の開発基盤とするため、HPV 生活環と感染・発癌における宿主応答・防御機構の詳細な解析を継続した。HPV 疫学調査については、WHO にて標準化された HPV ジェノタイプング法を用いて、我が国の HPV 感染実態の調査と HPV ワクチンの有効性評価を行った。さらに製剤担当室として、HPV ワクチンの国家検定を担当した。

第二室では、新興・再興感染症の病原となる易変異性 RNA ウイルスの基礎・応用研究を推進している。計算科学の解析環境の整備・強化を進めながら、ウイルス学、病原体サーベイランス組織、有機合成化学等の専門家と連携して学際研究を展開することにより、研究の質と速度の向上を図っている。特に変異が生体高分子の構造・機能に及ぼす影響をコンピュータシミュレーションする技術を重点的に強化し、様々な感染現象の構造原理の解明、創薬シーズ探索、変異病原体のリスク評価などに役立っている。本年度は、分子モデリングと分子動力学シミュレーションを用いて、ウイルスの感染、複製、中和、適応進化の構造生物学研究を進め、成果を関連部署・研究グループに提供した。

第三室は次世代シーケンサーを用いて病原体ゲノム情報の取得と情報解析に係る基盤整備を遂行している。病原体分離株の全ゲノム解析で病原性・薬剤耐性因子を同定するとともに、全ゲノム情報を基盤にしたゲノム分子疫学の基盤データベースの構築に取り組んでいる。また、各種病原体検査法で陰性であった感染症疑いの不明症例についてメタゲノム解析にて病原体検出を行っている。臨床検体に内在す

る全容を核酸配列として網羅的に検出するため、混合感染など総合的な病原体検査法として有効である。本年度は、大規模細菌ゲノム比較解析および完全長細菌ゲノム解析を行うための基盤作成および改良、および、ゲノムデータベース作成を中心に業務を展開した。バイオインフォマティクス解析を検査現場でも有効に執り行うことができるよう、ゲノムデータベース管理および次世代シーケンサーデータ解析を同時に行えるシステム GenEpid-J (Genomics and Epidemiology in Japan)をこれまでに構築し、継続して運用している。本システムを用いて、病原細菌、薬剤耐性菌、ウイルスのゲノム解析及びデータベース管理を実施している。それらデータベース上のゲノム情報を用いて、大規模ゲノム比較解析およびゲノム分子疫学解析も遂行した。また、細菌感染症において重要な生物種の公開ゲノム配列および生解読データを回収し、GenEpid システムで解析した結果をデータベース化する gGENEPID の開発・運用を引き続き運用している。感染症が疑われる難病及び原因不明症例のメタゲノム解析も進めており、これらデータ解析も、GenEpid システムで運用している。薬剤耐性細菌のワンヘルスアプローチの一環として、下水処理排水のメタゲノム解析、ESBL およびカルバペネム耐性細菌の分離およびゲノム解析も進めている。更に、真核生物のゲノム解析にも着手し、昆虫ゲノム解析およびヒト培養細胞のバイオインフォマティクス解析も進めている。昨年度に続き、本年度も、SARS-CoV-2 のゲノム解析およびゲノムサーベイランスに重点を置き、地方自治体、本研究所の各部・センターと協力し、感染拡大を抑制するためのゲノムデータの蓄積および解析を行なっている。

業績 調査・研究

1. HPV に関する研究

1. HPV の感染増殖機構の研究

(1) HPV 細胞侵入機構の解明

ゲノムワイドな CRISPR-Cas9 ノックアウトスクリーニングにより、HPV18 の細胞侵入に関わる宿主タンパク質の同定を試みた。既知のヘパラン硫酸プロテオグリカン、Gamma secretase 複合体、ER-Golgi および小胞輸送関連タンパク質

が同定された。さらに、mTOR シグナル関連タンパク質、コニファイドエンベロップ、プロテアソームの関与が示唆された。mTOR シグナル関連タンパク質から、Small GTPase-activating protein である Folliculin (FLCN) に焦点を当て解析を進めた。FLCN は HPV 粒子の細胞内への最初のエントリーに寄与していることがわかった。(石井克幸、関塚剛史、山地俊之[細胞化学部]、本間悠太[細胞化学部])

(2) HPV16 E1 タンパク質により発現が変動する細胞遺伝子の探索

E1 タンパク質の野生型(WT)、ATPase 活性を失った変異体(K483A)、アジア型バリエーション(M491I)を発現プラスミドから過剰発現させた HEK293 細胞、及びベクタープラスミドのみ(vector)を導入した HEK293 細胞から全 RNA を精製し、次世代シーケンサーによる RNA-Seq 解析を行った。その結果、WT/M491I 細胞で vector/K483A 細胞と比べて mRNA の発現レベルが 189 遺伝子で上昇し、36 遺伝子で減少していることが示された。発現が上昇している遺伝子群に、NF κ B 転写因子ファミリーに属する RELB と NFKB2 が含まれていた。また M491I 細胞では WT 細胞と比べて、より高レベルの RELB/NFKB2 が発現していた。NF κ B に応答するリポータープラスミドを用いたリポーターアッセイにおいて、M491I は WT と比べて高い転写活性化を示したことから、M491I で誘導される高い NF κ B 活性は RELB/NFKB2 によるものと考えられた。(田中恒成、終元巖)

(3) PTEN が HPV 複製に及ぼす作用の解析

E1 タンパク質を発現させた HEK293 細胞において、細胞内セカンドメッセンジャーとして働く重要な内在性分子であるホスホイノシチドについて、LC-MS/MS 質量分析によるホスホイノシチド分子種の検出・定量を行った。その結果、WT/M491I 細胞で vector/K483A 細胞と比べて PIP3 及び PI(4,5)P2 レベルが低下していることが示された。前年度に PTEN の発現により HPV 複製が抑制されることを報告しており、PIP3 は HPV 複製を正に制御していると考えられる。E1 発現細胞では何らかのメカニズムにより PIP3 を低レベルに抑えることで、過剰なウイルス複製を防いでいる可能性が示された。(終元巖、佐々木雄彦[東京医科歯科大学])

2. HPV 感染状況についての調査・研究

(1) 子宮頸癌及び前癌病変での HPV 遺伝子型分布の調査
子宮頸癌及び前癌病変(CIN2/3)の擦過細胞検体を慶應大学病院にて定期的に収集して、HPV DNA 検出と HPV ジェノタイプングを継続的に行った。本年度は 264 検体の HPV タイピングを実施した。(中村浩美、終元巖、岩田卓[慶應大学])

(2) HPV31 ゲノム配列解析

HPV31 は HPV16, HPV52, HPV58 について、日本人の子宮頸部前癌病変(CIN2/3)で検出される高リスク HPV 型である。HPV タイピングにて HPV31 が検出された子宮頸部擦過細胞検体 45 例(SCC, 4 例; CIN2/3, 33 例; CIN1, 2 例; NILM, 3 例; 不明 3 例)より DNA を抽出し、全長 HPV31 ゲノムを PCR にて増幅したのち、次世代シーケンサーを用いてその配列を決定した。ウイルスゲノムの系統樹解析の結果、lineage A が 17 例(38%)、lineage B が 23 例(51%)、lineage C が 4 例(9%)、不明が 1 例(2%)の内訳であった。(小暮剛太、終元巖、岩田卓[慶應大学]、小貫麻美子[昭和大学]、松本光司[昭和大学])

(3) HPV ワクチン効果を検証するための疫学研究

前癌病変及び子宮頸癌と診断された 40 歳未満の日本人女性における HPV16/18 検出率を経年的に調べることで、人口レベルでの HPV ワクチン導入効果を検証することを目的として(思春期女性への HPV ワクチン公費助成開始後における子宮頸癌の HPV16/18 陽性割合の推移に関する疫学研究: MINT study II)、全国 23 か所の拠点病院で子宮頸部擦過細胞検体を収集し、国立感染症研究所にて HPV タイピングを実施している。(中村浩美、終元巖、小貫麻美子[昭和大学]、松本光司[昭和大学]、MINT study group)

(4) 日本人女性における HPV ワクチンの有効性評価

CIN2-3, AIS, 浸潤性子宮頸癌と診断された 40 歳未満の日本人女性(n=5795)の HPV 遺伝子型結果を、HPV ワクチン接種歴とともに分析した。ワクチン標的型 HPV16 または HPV18 の CIN2-3/AIS での検出率は、ワクチン未接種女性(n=4297)では 47.0%であったが、12-15 歳でワクチン接種した女性(n=36)で 0.0%、16~18 歳(n=23)で 13.0%、19~22 歳(n=14)で 35.7%、22 歳以上(n=91)で 39.6%であり、18 歳以下での接種者で感染予防効果が高いことがわかった。また、CIN2-3/AIS の女性で、14 歳までに性行為を行った割合は 9.2%であるのに対し、16 歳までだと 47.2%、18 歳までだと 77.1%に急速に増加した。さらに、CIN2-3/AIS における HPV16/18 の検出率は、初回性交前(n=16)、初回性交後 3 年以内(n=8)、3 年以上後(n=15)の接種女性でそれぞれ 0.0%、12.5%、40.0%であった。12~14 歳の女子に対する HPV ワクチンの定期接種と、18 歳以下の女性に対するキャッチアップ接種の重要性が示唆された。(終元巖、小貫麻美子[昭和大学]、松本光司[昭和大学]、MINT study group)

(5) HPV 型分布の国内地域差の解析

子宮頸部上皮内新形成(CIN)または浸潤性子宮頸癌を有する日本人女性 6346 人を対象に、HPV 型の陽性率の地域差を調べた。各疾患分類における高リスク 1 型と低リスク型の HPV の検出頻度を東日本と西日本で比較検討した。CIN 進行のリスクは、CIN2/3 と CIN1 に対する各 HPV 型の検出率比 (PR) を算出することで評価した。調査した HPV 型のうち、HPV52 は CIN1 患者において東日本より西日本で有意に多く検出されたが、CIN2/3 では検出頻度が少なかった。CIN2/3 女性における HPV52 感染の検出率は、東日本では CIN1 女性よりも有意に高かったが (PR, 1.93; 95% CI, 1.48-2.58)、西日本では有意差は見られなかった (PR, 1.03; 95% CI, 0.83-1.30)。(終元巖、小貫麻美子 [昭和大学]、松本光司 [昭和大学]、MINT study group)

3. HPV 感染による発癌機構の研究

(1) HPV の遺伝子発現に関与する宿主因子の探索

HPV の初期遺伝子は、子宮頸癌細胞の増殖に必須なウイルスの癌タンパク質である E6/E7 をコードし、HPV ゲノムの転写調節領域 (LCR) により発現が制御される。これまでに、細胞の転写因子 TEAD1 が LCR に結合し、初期遺伝子の転写を活性化することを明らかにしている。TEAD1 と複合体を形成して転写を調節する宿主因子を探索する目的で、野生型および TEAD1 結合配列に変異を導入した LCR-DNA に結合する子宮頸癌細胞の核タンパク質を Data independent acquisition (DIA) プロテオーム解析によって網羅的に調べた。変異導入により、TEAD1 を含む約 50 種類の宿主タンパク質の LCR-DNA への結合が 1/3 以下に減少した。今年度は、これらのタンパク質のうち、細胞の遺伝子に対する転写活性化能が報告されている炎症性サイトカイン S100A9 に注目し解析を行った。クロマチン免疫沈降実験により、子宮頸癌細胞内で S100A9 が LCR に結合することが示された。子宮頸癌細胞で S100A9 を siRNA によりノックダウンすると E6/E7 の発現が減少し、過剰発現させると増加した。子宮頸癌細胞をホルボールエステルで処理すると、核内の S100A9 の発現及び LCR への結合が増加し、LCR からの転写活性が上昇した。S100A9 は DNA 結合能を持たないことから、TEAD1 を介して LCR に結合し、転写共役因子として HPV 初期遺伝子の転写を活性化すると考えられる。今後、S100A9 と TEAD1 の結合等を詳しく調べる必要がある。(森清一郎)

(2) HPV18 初期プロモーター活性化の分子機構

子宮頸癌組織において HPV18 は HPV16 に次いで多く検出されるが、悪性化のスピードは HPV16 より速い。HPV18 の初期プロモーター活性が HPV16 に比べ高いことに着目し、そのメカニズムを解析した。HPV16 と HPV18 の初期プロモーター制

御領域 LCR のキメラを用いた、ヒト不死化角化細胞 (NIKS) でのレポーターアッセイにより、HPV18 プロモーターの高活性化を担うシス領域が転写開始点から 100~200 塩基上流に存在することがわかった。(石井克幸)

(3) HPV16 E7 により発現が変動する細胞遺伝子の解析

HPV16 の三つのバリエント (A1, A4, A5) は、それぞれ特徴的なアミノ酸配列を持つ E7 タンパク質 A1 (WT), A4 (N29S), A5 (L28F) をコードしている。これらの E7 の細胞機能の違いを明らかにするために、E7 を発現する組換えレトロウイルスを作成し、HCK1T に感染させて、それぞれの E7 を安定に発現する細胞を得た。同時にコントロールとしてベクターウイルスを感染させた細胞も作成した。これらの細胞から全 RNA を調製し、次世代シーケンサーによる RNA-seq 解析を行った。iDEP 及び Metascape による発現変動遺伝子群のパスウェイ解析の結果、L28F 発現細胞では他の細胞と比べて、Reactome Gene Sets の Regulation of expression of SLITs and ROBOs (R-HSA-9010553) に含まれる遺伝子群の顕著な発現上昇が認められた。また N29S 発現細胞では ZC3H11A の発現低下が検出された。一方、ウェスタンブロットにてタンパク質レベルの変化を検討したところ、ZC3H11A の発現量には E7 バリエント間で違いは認められなかった。(終元巖)

4. HPV 持続感染細胞モデルの作製

高リスク型 HPV は粘膜基底細胞に持続感染し、細胞を癌化する。粘膜角化細胞に特徴的な遺伝子発現プロファイル FANTOM5 (理研) のトランスクリプトームデータを用いて探索した。表皮角化細胞を比較対象とした。粘膜角化細胞で発現上昇する遺伝子に特徴的なパスウェイは見つからなかったが、表皮角化細胞では角化に関与する遺伝子群の発現上昇が見られた。粘膜角化細胞で 19 種、表皮角化細胞で 13 種の転写因子がそれぞれ 10 倍以上発現上昇していた。これらの転写因子の結合配列の出現頻度を調べると、粘膜角化細胞では GLIS1、表皮角化細胞では HOXC11、HOXC9、EN1 の結合配列がその他の発現上昇遺伝子の転写開始点上流により多く存在しており、遺伝子発現に全般的な影響を与えていることが示唆された。これらの転写因子の発現を培養角化細胞において変化させることで HPV の持続感染に影響を与える可能性がある。(竹内隆正)

5. 日本人に特異的な HPV の分子進化解析

次世代シーケンシングにより日本人女性の子宮頸部擦過細胞から、HPV16 (172 例)、HPV18 (21 例)、HPV58 (57 例) の全長ゲノム配列を決定した。これらの日本株を含む

GenBank に登録されている HPV16 (627 例)、HPV18 (146 例)、HPV58 (157 例) の全長 HPV ゲノム配列を対象に、最尤法による分子系統樹解析を行った。その結果、HPV16 バリエント A4/A5 系統、HPV18 バリエント A1 系統、HPV58 バリエント A1 系統に、日本株のみで構成される特徴的なクラスターが検出された。次にタンパク質コード領域を連結した HPV ゲノム配列を対象として、BEAST2 によるベイズ系統樹解析を行った。その結果、これらの日本人特異的 HPV の共通祖先の分岐年代は、HPV16 A4 系統で約 97,000 年前、HPV16 A5 系統で約 39,000 年前、HPV18 A1 系統で約 38,000 年前、HPV58 A1 系統系統で約 26,000 年前と推定された。日本人特異的な HPV バリエントは、後期旧石器時代にアジア大陸から日本人の祖先とともに渡来し、大陸とは隔離された状況下で独自に進化したことが推察された。(田中恒成、小暮剛太、終元巖)

II. 臨床応用されたウイルスベクターの安全性・有効性に関する情報の収集

我が国での遺伝子治療臨床試験計画を審査する作業部に適切な意見を提供するため、Human Gene Therapy、Gene Therapy、Molecular Therapy、Journal of Gene Medicine、及び Nature Medicine 等の遺伝子治療専門誌の論文、日本遺伝子治療学会での講演等からウイルスベクターの安全性・有効性に関する情報を収集・検討する作業を継続して行った。特記すべき有害事象は認められなかった。(竹内隆正、森清一郎、石井克幸、終元巖)

III. *in silico* 解析を用いた構造生物学研究

III-1. HIV-1 の構造生物学研究

(1) 拡張アンサンブル法による HIV-1 エンベロープ三量体の構造的特徴の解析

ヒト免疫不全ウイルス1型 (HIV-1) の粒子表面上のエンベロープタンパク質は、三量体を形成することで主要中和エпитープを遮蔽することが知られている。しかし、遮蔽構造の発現・維持の分子メカニズムは未だ明らかにされていない。我々は、HIV-1エンベロープタンパク質三量体を、拡張アンサンブル法の一つである Gaussian Accelerated Molecular Dynamics (GaMD) シミュレーションにより調べ、中和抵抗性株と中和感受性株の構造的な特徴を比較した。MD シミュレーションは Amber16 の pmemd.cuda モジュールにより実行した。計算条件は、温度 310K、圧力 1 bar、塩濃度 150 mM NaCl とした。2 ns の Conventional MD 後、2 μ s の GaMD を実行した。GaMD により得られたトラジェクトリーは AmberTools17 の cpptraj により解析した。GaMD により得られたエンベロープタンパク質三量体の平衡構造は、中和抵抗性株では、それぞ

れのプロトマーが対称に配置されていた。一方、中和感受性株では、非対称に配置され、時間とともに変化していることが明らかになった。(横山勝、小谷 治、中村浩美、佐藤裕徳)

(2) HIV-1 エンベロープにおける脆弱部位の推定

HIV-1 は易変異性ウイルスであり、変異を許容し難い脆弱部位は明らかでない。ウイルス粒子表面に位置するエンベロープの脆弱部位を知ることができれば、その部位はウイルスにとって致命的な治療標的となる。これまで、HIV-1 Env-gp41 に、高度にアミノ酸残基が保存されたセクターを見出した。ここでセクターとは、機能的あるいは構造的に制約がかかっているアミノ酸残基のセットのことである。このセクターを構成する 5 つのアミノ酸残基のアラニン変異体 (gp41 変異体群) では、いずれも感染性が消失することを明らかにした。しかしながら、この gp41 の脆弱部位のウイルス複製における意義・役割は明らかでない。本研究では、gp41 脆弱部位のウイルス複製における意義・役割は明らかにするために、野生株および gp41 変異体群の gp160 単量体の分子動力学計算を行った。gp41 変異体群は、脆弱部位だけではなく、gp120/gp41 切断部位の構造や揺らぎが野生株と異なっていた。この結果は、プリンあるいはプリン様プロテアーゼにより、gp41 変異体群では gp120/gp41 が切断されない実験結果と一致すると考えられる。(横山勝、小谷治、土肥直哉 [徳島大]、駒 貴明 [徳島大]、野間口雅子 [徳島大]、佐藤裕徳)

(3) HIV-1 Pr55 Gag 構造機能制御部位を標的とする創薬研究

HIV-1 粒子形成過程の主要な構造タンパク質は Pr55Gag である。しかし、未だ Pr55Gag を標的とする抗 HIV 薬は研究開発途中である。Pr55Gag の構造生物学研究を展開し、新規の抗 HIV 薬の有力標的の同定を目指す。これまでインシリコ技術を用いて、既知の Pr55Gag 部分構造と類似した Pr55Gag 全長構造を予測した。今年度は、予測した Pr55Gag 全長構造を用いて、Pr55Gag 二量体モデルを構築した。さらに、Pr55Gag 二量体モデルのインシリコ変異導入解析により、二量体化制御残基を予測した。これらの変異情報を共同研究者に提供し、Pr55Gag 不定形領域が Pr55Gag 二量体形成能の制御機能を持つことを見出した。(小谷 治、横山 勝、野間口 雅子 [徳島大学]、片平 正人 [京都大学]、村上 努 [エイズ研究センター]、佐藤 裕徳)

(4) tRNA の Pr55Gag 構造機能制御機構の構造生物学的研究

tRNA は、HIV 粒子形成の制御因子である。tRNA は Pr55Gag のマトリックス (MA) 領域と相互作用し、Pr55Gag の細胞膜への

特異的輸送を調節している。しかし、未だtRNAの活性制御部位は不明である。今年度は、Pr55Gagと相互作用するtRNAのインシリコ構造解析基盤を構築し、その研究プラットフォームを活用して、tRNAのトランス制御領域を同定した。tRNAProとMAIドメインの複合体モデルを構築し、tRNAの相互作用情報を予測した。その情報を共同研究者に提供し、実験の変異導入・組み替え実験の結果よりtRNAの活性制御部位を同定した。(小谷 治、Christopher Sumner[ミシガン大学]、佐藤裕徳、小野 陽[ミシガン大学])

III-2. インフルエンザウイルスの構造生物学研究

(1) 抗インフルエンザHAストーク抗体による中和と中和逃避の構造生物学的研究

様々なインフルエンザウイルス亜型に対して広域中和能を有する抗HAストーク抗体の研究開発に向けて、抗HAストーク抗体F11による中和と中和逃避の構造基盤の構築を目指す。今年度は、インシリコ変異導入解析法を用いて、F11抗体変異情報を共同研究者に提供し、予測と検証による抗体改変研究基盤の構築を行った。その結果、インシリコでHA結合能を向上すると予測した抗HAストーク抗体F11変異体は実験でHA結合能が向上し、F11耐性のA(H1N1)pdm09ウイルスを中和した。一方、HA結合能を低下する変異体は、実験でHA結合能が維持されつつも、F11感受性ウイルスを中和することができなかった。したがって、インシリコ誘導型実験が新しい表現型を持つ抗HAストーク抗体の作製に有用であることが示唆された。この研究成果は、世界で初めて構造ベースで抗HAストーク抗体改変に成功した一例として公表した。(小谷 治、齊藤 慎二[感染病理部]、鈴木 康司[インフルエンザウイルス研究センター]、相内 章[感染病理部]、上野 朗[感染病理部]、逸見 拓矢[感染病理部]、佐野 芳[感染病理部]、田畑 耕史郎[感染病理部]、横山 勝、鈴木 忠樹[感染病理部]、長谷川 秀樹[インフルエンザウイルス研究センター]、佐藤 裕徳)

(2) インフルエンザウイルスの進化の方向性とリスク評価系の構築

現在、新たに生じたインフルエンザウイルス変異株の伝播リスクを定量的に評価する系は無い。変異ウイルスの伝播リスクを定量的に評価し、流行規模を予測する数理モデルの構築は、世界の公衆衛生対策の強化につながる。本研究では、情報・計算科学の手法を用いて数理モデル構築に必要な基礎データを収集し、流行リスク等を定量的に評価し、サーベイランス・実験データと照合する連携基盤を開発することを目的とする。インフルエンザウイルスのリスク評価およびワクチン株選定に役立つ情報の取得するために、HA 蛋白質の進化

の方向性を推定する解析法の開発を行った。インフルエンザウイルス感染拡大リスク評価するパラメータとして、構造安定性とシアル酸結合親和性に注目している。構造安定性および結合親和性の変化量が、感染伝播率の変化量に比例する数理モデルを構築した。(横山 勝、小谷 治、中村浩美、藤崎誠一郎[インフルエンザウイルス研究センター]、渡邊真治[インフルエンザウイルス研究センター]、佐藤裕徳)

III-3. デングウイルスの構造生物学研究

(1) デングウイルス 2 型 E タンパク質と中和抗体の分子動力学計算による解析

デングウイルスによる感染症の重症型デング発症機序の一つとして抗体依存性感染増強(ADE)があり、単クローン抗体には、増強活性の強い抗体と中和活性の強い抗体がそれぞれ存在する。デングウイルスと中和抗体の結合様式の解明は、ADE を避けた治療抗体やワクチンの開発に重要な基盤となる。本研究ではマヒドン大学のデングウイルス感染者由来ヒト単クローン抗体とデングウイルス E タンパク質の結合様式の解析を分子動力学シミュレーションにより行い、得られた平衡構造を用いて、in silico 変異導入解析により抗体からの逃避変異の予測を行った。分子動力学シミュレーションに用いた 2 種類の単クローン抗体は、共に E タンパク質の fusion loop 近傍に結合していた。次に、分子動力学シミュレーションにより得られた構造を用いて、E タンパク質の単クローン抗体の結合部位近傍に in silico で変異導入解析を行った。その結果、2 種類の単クローン抗体との結合エネルギーが変異により減少する 5 座位と4座位を E タンパク質に見出した。(横山勝、中山英美[大阪大学 微生物病研究所]、小谷 治、塩田達雄[大阪大学 微生物病研究所]、佐藤裕徳)

IV. 大規模ゲノム解析のための自動解析パイプラインの開発

次世代シーケンサー(NGS)の解読リードを用いた *de novo* assemble、解析対象サンプルの生物種推定、血清型推定、コンタミネーションの確認、MLSTによるタイピング、薬剤耐性遺伝子・病原遺伝子検索、プラスミド検索、遺伝子抽出および遺伝子のアノテーションを全て自動で行うためのパイプライン Automatic Microbial Genome Annotation (AMiGA)を構築している。細菌ゲノムの NGS データを公開データベースより回収し、本プログラムにて解析を行い、データベース gGENEPIDの構築している。現在、公衆衛生上重要となる病原細菌 36 種、合計約 95 万サンプルのゲノム解析データを格納している。更に、今年度は、AMiGA パイプラインの改良と、SARS-CoV-2 のゲノム解析を行う web アプリケーション (COG-JP)の改良を実施し、地方衛生研究所が解読したゲノ

ム解読データの解析を行う基盤を構築した。(関塚剛史、谷津弘仁、糸川健太郎、黒田誠)

V. バイオテロ・新興再興感染症・薬剤耐性菌対策としての超高速ゲノム解読・解析システムの構築

バイオテロ・新興再興感染症による非常事態に対応するため、“迅速・網羅的・正確”を兼ね備えた次世代シーケンサーによる超高速ゲノム解読システムをこれまで構築してきた。また、完全長ゲノム配列を取得することは、病原細菌の保有する病原因子及び薬剤耐性遺伝子の伝達様式を明確にする際に重要となり、ゲノム分子疫学解析の際の参照配列にもなる。今年度は、SARS-CoV-2 ゲノム配列決定に重点を置き、本年度までに、合計 20,4194 サンプルの全長ゲノム配列を取得し、公開データベース GISAID にて公開済みである。(関塚剛史、糸川健太郎、橋野正紀、谷津弘仁、田中里奈、黒田誠)

国内における破傷風菌の実態を把握するため、土壌より分離された破傷風菌のゲノム解読および比較ゲノム解析を実施した。その結果、国内で分離された破傷風菌は、国外のものとは異なる系統が存在し、また、毒素産生量と関連する系統が存在することが示唆された。(関塚剛史、黒田誠; 志多田千恵、坂本智代美、高橋元秀[熊本保健科学大学・生物毒素・抗毒素共同研究講座])

VI-1. SARS-CoV-2 比較ゲノム分子疫学解析

2019 年 12 月より世界的に流行している新型コロナウイルス SARS-CoV-2 について、患者検体 RNA から効率的にウイルスの全ゲノム配列を決定するための実験プロトコルの改良・開発を行った。特に、2021 年度より出現し急速に感染者が増加した変異株(デルタ株、オミクロン株)について、変異によるミスマッチを考慮した改良を行い、継続的にゲノム解析を行えるように対応した。(糸川健太郎、小神野明紀奈、佐々木直文、関塚剛史、橋野正紀、田中里奈、江藤皐、染野里沙、黒田誠)

SARS-CoV-2 ゲノムの自動解析パイプラインを作成し、ネットワーク解析結果を描画・閲覧する web サイト(COG-JP)の改良を行なった。国内における SARS-CoV-2 の lineage の推移をモニタリングし、本年度に国内で生じた感染ピークにおけるゲノム比較解析およびサーベイランスを行なった。海外より帰国した有症者から検出された本ウイルスのゲノム比較解析も実施し、懸念される変異系統 (variant of concern)の出現の監視と国内における伝播の有無の確認を行なった。また、SARS-CoV-2 のゲノム解析データ量が膨大になったため、データ管理の自動化を進めている。

(関塚剛史、糸川健太郎、橋野正紀、佐々木直文、田中里

奈、谷津弘仁、黒田誠; 影山努、齊藤慎二、高山郁代、浅沼秀樹、長谷川秀樹 [インフルエンザウイルス研究センター]、松山州徳、白戸憲也、竹田誠[ウイルス第三部]、高橋琢理、神谷元、山岸拓也、柿本健作、鈴木基 [感染症疫学センター]、鈴木忠樹[感染病理部]、脇田隆宇 [国立感染症研究所]、他多数の地方衛生研究所・保健所・検疫所関係者)

VI-2. ラボネットワーク強化のための SARS-CoV-2 ゲノム配列解読及び解析法の研修

地方衛生研究所および空港検疫所の職員を対象に、新型コロナウイルスのゲノム解読法および解析法についての研修会を行った。令和 3 年度は 8 度開催し、60 か所以上の自治体・機関からの参加があった。また、イルミナ社およびオックスフォードナノポア社のシーケンサーを用いたゲノム配列解読法の動画付きプロトコルを作成し、病原体検出マニュアルとして公開した。本研修会の成果により、多数の自治体において、単独でゲノム解読から解析まで行うことが可能となり、各自治体の行政へ、更に迅速にデータを報告することが可能となった。((糸川健太郎、小神野明紀奈、佐々木直文、関塚剛史、橋野正紀、田中里奈、江藤皐、染野里沙、黒田誠)

VII. 多剤耐性菌感染症の疫学と国内における対応策に関する研究

薬剤耐性(AMR)感染症が世界的に拡大しており、2015 年には WHO から AMR グローバルアクションプランが提唱され、サーベイランス・研究を通じた実態把握の強化が急務となっている。これまでに、ゲノムセンターでは所内および所外の研究者との共同研究で、多数の薬剤耐性菌のゲノム解析を行ってきた。それらデータを管理・運用し、且つ、多検体の解析を簡便に行うためのシステム GenEpid-J (Genomics and Epidemiology in Japan)を運用している。現在、臨床・動物・環境由来の多種にわたる細菌のゲノムデータが蓄積されており、今年度までに計約 700 株の薬剤耐性菌のゲノム配列を決定し、データベースを作成した。また、下水および下水処理排水のメタゲノム解析および薬剤耐性遺伝子の網羅解析 (resistome 解析)を行い、薬剤耐性遺伝子の検出状況を比較した。(関塚剛史、田中里奈、谷津弘仁、橋野正紀、黒田誠; 金森肇[東北大学大学院医学系研究科内科病態学講座・総合感染症学分野]、楠本正博、玉村雪乃、グルゲ キー ルティ・シ リ[国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構]、松永展明、大曲貴夫[国立国際医療研究センター・AMR 臨床リファレンスセンター]、他多数の地方衛生研究所関係者)

病院施設では抗菌剤を常に利用していることから、病院汚水中には薬剤耐性菌および抗菌剤が存在している。病院施

設へのオゾンによる高度排水処理装置の社会実装を実施し、病院排水中の薬剤耐性菌及び抗菌薬に対する不活化効果の評価を行った。オゾン処理を20分行うことで、腸内細菌群、ESBL 薬剤耐性菌の減少が確認され、また、残留抗菌薬の中でも Levofloxacin は10分で10%程度まで減少し、オゾン処理が非常に有効な手段であることが明らかとなった。(関塚剛史、黒田誠; 東剛志[大阪医科薬科大学大学院薬学研究科]、片桐美和、渡邊学[東邦大学医学部医学科])

VIII. 結核菌全ゲノム薬剤耐性マーカー検出と感受性予測の構築

未だ先進国内において罹患率が高く、世界的にも多剤耐性が問題になっている結核菌のためのゲノム分子疫学解析パイプライン TGS-TB (Total Genotyping Solution for *Mycobacterium tuberculosis* (TB)) を構築し、運用している。薬剤耐性予測データベースの改良と特異度・感度の高い薬剤感受性予測ツールも開発し、運用している。本年度は、結核菌の国内分離株の大規模分子系統解析を円滑に行うための web 解析ツールの改良およびデータベース構築を行なった。(関塚剛史、谷津弘仁、黒田誠、村瀬良朗[公益財団法人結核予防会結核研究所]、瀧井猛将[公益財団法人結核予防会結核研究所]、岩本朋忠[神戸市環境保健研究所]、御手洗聡[公益財団法人結核予防会結核研究所]、加藤誠也[公益財団法人結核予防会結核研究所])

IX. 膿瘍患者由来 *Streptococcus intermedius* における7型分泌装置依存的細胞傷害性の解析

小児脳膿瘍患者の膿瘍サンプルより原因菌として *Streptococcus intermedius* TYG1620 株が分離された。TYG1620 株の病原性解明を目的に、全ゲノム解読および *in vivo* 実験を実施した結果、Type 7 Secretion System (T7SS) が病原性に寄与する事が示唆された。さらに、*in vitro* 実験により T7SS 依存的な細胞傷害性の保有を見出すとともに、DIA 法による Secretome 解析を実施し、T7SS 依存的な分泌毒素候補を同定した。昨年度から引き続き、T7SS 依存的な分泌毒素候補の1つである Early Secreted Antigenic Target of 6 kDa (ESAT-6) like protein に着目し、解析を実施した。これまでに ESAT-6 like protein 欠損変異株の培養上清を使用した細胞傷害性の測定結果から、欠損変異株では親株と比較して傷害性の有意な減弱が認められ、ESAT-6 like protein が TYG1620 株の T7SS 依存的細胞傷害性に関与する事が示唆された。また細胞傷害性の測定に使用した培養上清中の含有タンパク質の網羅的同定を目的に DIA 法による Secretome 解析を実施した。Secretome 解析の結果、期待通りに欠損変異株では ESAT-6 like protein が検出されないこと

が確認された。加えて、欠損変異株培養上清では ESAT-6 like protein のみならず、複数の T7SS 依存的分泌タンパク質の顕著な減少が示された。つまり、ESAT-6 like protein は T7SS 依存的分泌タンパク質であると同時に、T7SS を介したタンパク質分泌機構にも寄与している可能性が考えられた。(橋野正紀、糸川健太郎、関塚剛史、黒田誠)

X. 病原性及び感染成立に関与する宿主因子の探索に関する研究

CRISPR/Cas9 システムを用いた、培養細胞ノックアウトライブラリーにより、細菌毒素、ウイルスタンパク質と結合及び相互作用する宿主側因子を把握することが可能となる。NGS を用いた deep sequencing による網羅的な解析が必須であり、これまで、解析用 web アプリケーションを開発してきた。本年度は、ムンプスウイルスが細胞から出芽する際に関連する宿主因子をプロテオーム解析により抽出し、さらに、関連宿主因子のインタラクトームおよびネットワーク解析を実施し、それら因子の関係性を明らかにした。(関塚剛史、黒田誠; 加藤大志[ウイルス第三部]、竹田誠[ウイルス第三部]、山地俊之[細胞化学部])

XI. 薬剤耐性熱帯熱マラリア株の新規ゲノムアセンブリ

昨年度までに、カンボジア由来の熱帯熱マラリア計二株のゲノムアセンブリを完了していたが、これに加え、タイ国境付近で得られたアルテシニン耐性株のゲノムアセンブリを行い、ゲノム配列を得ることができた。

また、耐性・感受性の計二株についてトランスクリプトーム解析を行い、遺伝子発現量の比較解析を行った。この結果、両株で優位に発現量が異なる遺伝子を特定することができた。

(糸川健太郎、小林大介[昆虫医科学部]、新澤直明[東京医科歯科大])

XII. 病原体ゲノム情報と実地疫学情報の統合解析システムと情報共有プラットフォームの開発

SARS-CoV-2 の国内感染拡大に端を発した病原体ゲノム・サーベイランスのニーズの拡大を踏まえ、疫学的実地調査とゲノム・サーベイランスの統合的解析を行うデータ分析基盤の整備を支援し、感染症対策における分析手法等の共通化、および知識・技術の共有化を図るため、分析データの可視化と共有に必要となる情報共有プラットフォームの開発を行った。まず、ゲノム解析機関から得られた SARS-CoV-2 配列情報の付帯情報から地理情報を抽出し、時系列に沿って地図上に表示するユーザー操作可能なアプリを開発した。次に、病原体ゲノム配列情報から同一配列集団の構造を系統

樹上に表示する既存ソフトへの入力データの生成の一部を自動化するアプリを開発し、ラボネットワークに参画するメンバーに対して公開した。また、GISAID との連携解析として、全ゲノム配列情報に基づいた感染の動向や塩基変異のトレンドを動的に追跡・分析するための有用なオープンソースウェブサービスである covSPECTRUM(<https://cov-spectrum.org/>)について、国内ゲノム解析機関から GISAID にデータが反映されるまでの時間差によって生じる表示内容の違いを軽減するため、当センターの自動解析パイプラインに一時的に保存されたゲノム配列データを利用するようにデータベースを再構築した内部利用専用の covSPECTRUM サーバを、別途当センター内に構築した。
(佐々木直文、関塚剛史、黒田誠)

品質管理に関する業務

HPV ワクチンの国家検定

HPV ワクチン(2 価、4 価、9 価ワクチン)の検定を製剤担当室として担当した。検定試験項目の内、VLP 力価試験を試験担当室として実施した。また HPV ワクチンの製造・試験記録等要約書(summary lot protocol)の審査を実施した。(石井克幸、竹内隆正、森清一郎、終元巖、黒田誠)

国際協力関係業務

WHO HPV ラボラトリーネットワーク活動

WHO によって結成された HPV ラボラトリーネットワーク(HPV ラボネット)の、西太平洋地域リファレンスラボとしての活動を行った。HPV DNA proficiency panel study 2021 に参加し、HPV タイピング結果を報告して、信頼性の高い HPV 検査ラボとしての認定を受けた。(中村浩美、終元巖)

発表業績一覧

I. 誌上発表

1. 欧文発表

- 1) Yamashita-Kawanishi N, Chang CY, Chambers JK, Uchida K, Sugiura K, Kukimoto I, Chang HW, Haga T. Comparison of prevalence of *Felis catus* papillomavirus type 2 in squamous cell carcinomas in cats between Taiwan and Japan. *J Vet Med Sci.* 83(8):1229-1233, 2021.
- 2) Hayashi S, Iwata T, Imagawa R, Sugawara M, Chen G, Tanimoto S, Sugawara Y, Tanaka I, Matsui T, Nishio H, Nakamura M, Katoh Y, Mori S, Kukimoto I, Aoki D. Transcription Factor Homeobox D9 Drives the Malignant Phenotype of HPV18-Positive Cervical Cancer Cells via Binding to the Viral Early Promoter. *Cancers (Basel).*

13(18):4613, 2021.

- 3) Que L, Li Y, Dainichi T, Kukimoto I, Nishiyama T, Nakano Y, Shima K, Suzuki T, Sato Y, Horike S, Aizaki H, Watashi K, Kato T, Aly HH, Watanabe N, Kabashima K, Wakae K, Muramatsu M. Interferon-gamma induced APOBEC3B contributes to Merkel cell polyomavirus genome mutagenesis in Merkel cell carcinoma. *J Invest Dermatol.* Dec 27:S0022-202X(21)02636-1, 2021.
- 4) Onuki M, Yamamoto K, Yahata H, Kanao H, Yokota H, Kato H, Shimamoto K, Takehara K, Kamiura S, Tsuda N, Takei Y, Shigeta S, Matsumura N, Yoshida H, Motohara T, Watari H, Nakamura K, Ueda A, Tasaka N, Ishikawa M, Hirashima Y, Kudaka W, Taguchi A, Iwata T, Takahashi F, Kukimoto I, Yoshikawa H, Yaegashi N, Matsumoto K. Human papillomavirus vaccine effectiveness by age at first vaccination among Japanese women. *Cancer Science*, 113:1428–1434, 2022.
- 5) Onuki M, Yamamoto K, Yahata H, Kanao H, Horie K, Konnai K, Nio A, Takehara K, Kamiura S, Tsuda N, Takei Y, Shigeta S, Nakai H, Yoshida H, Motohara T, Kato T, Nakamura K, Hamanishi J, Tasaka N, Ishikawa M, Kado N, Taira Y, Mori M, Iwata T, Takahashi F, Kukimoto I, Yoshikawa H, Yaegashi N, Matsumoto K, For The Mint Study Group. Changes in HPV16/18 Prevalence among Unvaccinated Women with Cervical Intraepithelial Neoplasia in Japan: Assessment of Herd Effects following the HPV Vaccination Program. *Vaccines*, 10(2):188, 2022.
- 6) Tanaka K, Kogure G, Onuki M, Matsumoto K, Iwata T, Aoki D, Kukimoto I. Ancient Evolutionary History of Human Papillomavirus Type 16, 18 and 58 Variants Prevalent Exclusively in Japan. *Viruses*, 14(3):464, 2022.
- 7) Koma T, Yokoyama M, Kotani O, Doi N, Nakanishi N, Okubo H, Adachi S, Adachi A, Sato H, Nomaguchi M. Species-Specific Valid Ternary Interactions of HIV-1 Env-gp120, CD4, and CCR5 as Revealed by an Adaptive Single-Amino Acid Substitution at the V3 Loop Tip. *J Virol*, 95:e0217720, 2021.
- 8) Kotani O, Suzuki Y, Saito S, Ainai A, Ueno A, Hemmi T, Sano K, Tabata K, Yokoyama M, Suzuki T, Hasegawa H, Sato H. Structure-Guided Creation of an Anti-HA Stalk Antibody F11 Derivative That Neutralizes Both F11-Sensitive and -Resistant Influenza A(H1N1)pdm09 Viruses. *Viruses.*, 13:1733, 2021.
- 9) Sumner C, Kotani O, Liu S, Musier-Forsyth K, Sato H, Ono A. Molecular Determinants in tRNA D-arm Required

- for Inhibition of HIV-1 Gag Membrane Binding. *J Mol Biol*, 434:167390, 2022.
- 10) Kobayakawa T, Yokoyama M, Tsuji K, Fujino M, Kurakami M, Boku S, Nakayama M, Kaneko M, Ohashi N, Kotani O, Murakami T, Sato H, Tamamura H. Small-Molecule Anti-HIV-1 Agents Based on HIV-1 Capsid Proteins. *Biomolecules* 2021, 11, 208.
 - 11) Sakuragi S, Kotani O, Yokoyama M, Shioda T, Sato H, Sakuragi J. Identification of a Novel Cis-Acting Regulator of HIV-1 Genome Packaging. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 3435.
 - 12) Nakashita M, Takagi Y, Tanaka H, Nakamura H, Serizawa Y, Ukai T, Azuma K, Chiba H, Terada K, Nakanishi K, Fujikawa T, Saito K, Yamaguchi R, Mitsuhashi Y, Yano K, Shibuma T, Kuzuma A, Tsuda S, Sadamoto T, Ishii Y, Ohara T, Hitomi Y, Hiroshima T, Yamagishi T, Kamiya H, Samuel A, Yahata Y, Shimada T, Arima Y, Suzuki M, Sekizuka T, Kuroda M, Sunagawa T. Singing Is a Risk Factor for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infection: A Case-Control Study of Karaoke-Related Coronavirus Disease 2019 Outbreaks in 2 Cities in Hokkaido, Japan, Linked by Whole Genome Analysis. *Open Forum Infect Dis.* 2022 Mar 23;9(5):ofac158.
 - 13) Sekizuka T, Saito M, Itokawa K, Sasaki N, Tanaka R, Eto S, Someno R, Ogamino A, Yokota E, Saito T, Kuroda M. Recombination between SARS-CoV-2 omicron BA.1 and BA.2 variants identified in a traveller from Nepal at the airport quarantine Facility in Japan. *J Travel Med.* 2022 Apr 20:taac051.
 - 14) Sekizuka T, Itokawa K, Saito M, Shimatani M, Matsuyama S, Hasegawa H, Saito T, Kuroda M. Genome Recombination between Delta and Alpha Variants of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Jpn J Infect Dis.* 2022 Feb 28.
 - 15) Iwata-Yoshikawa N, Shiwa N, Sekizuka T, Sano K, Ainai A, Hemmi T, Kataoka M, Kuroda M, Hasegawa H, Suzuki T, Nagata N. A lethal mouse model for evaluating vaccine-associated enhanced respiratory disease during SARS-CoV-2 infection. *Sci Adv.* 2022 Jan 7;8(1):eabh3827.
 - 16) Toyokawa T, Shimada T, Hayamizu T, Sekizuka T, Zukeyama Y, Yasuda M, Nakamura Y, Okano S, Kudaka J, Kakita T, Kuroda M, Nakasone T. Transmission of SARS-CoV-2 during a 2-h domestic flight to Okinawa, Japan, March 2020. *Influenza Other Respir Viruses.* 2022 Jan;16(1):63-71.
 - 17) Tsuchihashi Y, Yamagishi T, Suzuki M, Sekizuka T, Kuroda M, Itoi T, Matsumura A, Yamada N, Ishii Y, Kawamura N, Hitomi Y, Hiroshima T, Azuma K, Saito K, Kawanishi N, Tanaka S, Yamaguchi R, Yano K, Sunagawa T. High attack rate of SARS-CoV-2 infections during a bus tour in Japan. *J Travel Med.* 2021 Dec 29;28(8):taab111.
 - 18) Katagiri M, Kuroda M, Sekizuka T, Nakada N, Ito Y, Otsuka M, Watanabe M, Kusachi S. Comprehensive Genomic Survey of Antimicrobial-Resistance Bacteria in the Sewage Tank Replacement with Hospital Relocation. *Infect Drug Resist.* 2021 Dec 20;14:5563-5574.
 - 19) Watanabe R, Asai K, Kuroda M, Kujiraoka M, Sekizuka T, Katagiri M, Kakizaki N, Moriyama H, Watanabe M, Saida Y. Quick detection of causative bacteria in cases of acute cholangitis and cholecystitis using a multichannel gene autoanalyzer. *Surg Today.* 2021 Dec;51(12):1938-1945.
 - 20) Wagatsuma K, Sato R, Yamazaki S, Iwaya M, Takahashi Y, Nojima A, Oseki M, Abe T, Phyu WW, Tamura T, Sekizuka T, Kuroda M, Matsumoto HH, Saito R. Genomic Epidemiology Reveals Multiple Introductions of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 in Niigata City, Japan, Between February and May 2020. *Front Microbiol.* 2021 Oct 28;12:749149.
 - 21) Onodera T, Kita S, Adachi Y, Moriyama S, Sato A, Nomura T, Sakakibara S, Inoue T, Tadokoro T, Anraku Y, Yumoto K, Tian C, Fukuhara H, Sasaki M, Orba Y, Shiwa N, Iwata N, Nagata N, Suzuki T, Sasaki J, Sekizuka T, Tonouchi K, Sun L, Fukushi S, Satofuka H, Kazuki Y, Oshimura M, Kurosaki T, Kuroda M, Matsuura Y, Suzuki T, Sawa H, Hashiguchi T, Maenaka K, Takahashi Y. A SARS-CoV-2 antibody broadly neutralizes SARS-related coronaviruses and variants by coordinated recognition of a virus-vulnerable site. *Immunity.* 2021 Oct 12;54(10):2385-2398.e10.
 - 22) Adachi F, Sekizuka T, Yamato M, Fukuoka K, Yamaguchi N, Kuroda M, Kawahara R. Characterization of FRI carbapenemase-producing Enterobacter spp. isolated from a hospital and the environment in Osaka, Japan. *J Antimicrob Chemother.* 2021 Oct 11;76(11):3061-3062.
 - 23) Nakamura Y, Katano H, Nakajima N, Sato Y, Suzuki T, Sekizuka T, Kuroda M, Izutani Y, Morimoto S, Maruyama J, Koie M, Kitamura T, Ishikura H. SARS-CoV-2 is localized in cardiomyocytes: a postmortem biopsy case. *Int J Infect Dis.* 2021 Oct;111:43-46.

- 24) Sekizuka T, Itokawa K, Hashino M, Okubo K, Ohnishi A, Goto K, Tsukagoshi H, Ehara H, Nomoto R, Ohnishi M, Kuroda M; Virus Diagnosis Group (NIID Toyama) COVID-19 Genomic Surveillance Network in Japan (COG-JP). A discernable increase in the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 R.1 lineage carrying an E484K spike protein mutation in Japan. *Infect Genet Evol.* 2021 Oct;94:105013.
- 25) Shigemura H, Maeda T, Nakayama S, Ohishi A, Carle Y, Ookuma E, Etoh Y, Hirai S, Matsui M, Kimura H, Sekizuka T, Kuroda M, Sera N, Inoshima Y, Murakami K. Transmission of extended-spectrum cephalosporin-resistant Salmonella harboring a blaCMY-2-carrying IncA/C2 plasmid chromosomally integrated by ISEcp1 or IS26 in layer breeding chains in Japan. *J Vet Med Sci.* 2021 Sep 3;83(9):1345-1355.
- 26) Kawano-Sugaya T, Yatsu K, Sekizuka T, Itokawa K, Hashino M, Tanaka R, Kuroda M. Haplotype Explorer: an infection cluster visualization tool for spatiotemporal dissection of the COVID-19 pandemic. *G3 (Bethesda).* 2021 Aug 7;11(8):jkab126.
- 27) Ando N, Sekizuka T, Yokoyama E, Aihara Y, Konishi N, Matsumoto Y, Ishida K, Nagasawa K, Jourdan-Da Silva N, Suzuki M, Kimura H, Le Hello S, Murakami K, Kuroda M, Hirai S, Fukaya S. Whole Genome Analysis Detects the Emergence of a Single Salmonella enterica Serovar Chester Clone in Japan's Kanto Region. *Front Microbiol.* 2021 Jul 27;12:705679.
- 28) Arai N, Sekizuka T, Tamamura-Andoh Y, Barco L, Hinenoya A, Yamasaki S, Iwata T, Watanabe-Yanai A, Kuroda M, Akiba M, Kusumoto M. Identification of a Recently Dominant Sublineage in Salmonella 4,[5],12:i:- Sequence Type 34 Isolated From Food Animals in Japan. *Front Microbiol.* 2021 Jul 1;12:690947.
- 29) Sakuma C, Sekizuka T, Kuroda M, Hanada K, Yamaji T. Identification of SYS1 as a Host Factor Required for Shiga Toxin-Mediated Cytotoxicity in Vero Cells. *Int J Mol Sci.* 2021 May 6;22(9):4936.
- 30) Kuroki A, Itokawa K, Özbel Y, Komagata O, Osada Y, Omachi S, Sarkar SR, Rahman F, Paul SK, Kasai S, Sawabe K, Matsumoto Y, Noiri E, Sanjoba C. The frequencies of knockdown resistance mutations in phlebotomine sandflies under different degrees of indoor residual spraying. *Medical Entomology and Zoology* 72(4):229-236 2021.
- 31) Komagata O, Kasai S, Itokawa K, Minagawa K, Kazuma T, Mizutani K, Muto A, Tanikawa T, Adachi M, Komatsu N, Tomita T. Common substitution mutation F348Y of acetylcholinesterase gene contributes to organophosphate and carbamate resistance in Cimex lectularius and C. hemipterus.. *Insect biochemistry and molecular biology* 138:103637-103637 2021.
- 32) Itokawa K, Furutani S, Takaoka A, Maekawa Y, Sawabe K, Komagata O, Tomita T, Filho JLL, Alves LC, Kasai S. A first, naturally occurring substitution at the second pyrethroid receptor of voltage-gated sodium channel of Aedes aegypti. *Pest Management Science* 77(6):2887-2893 2021.
- 33) Amo-Bosompem M, Kobayashi D, Itokawa K, Murota K, Faizah AN, Azerigyik FA, Hayashi T, Ohashi M, Bonney JHK, Dadzie S, Tran CC, Tran OV, Fujita R, Maekawa Y, Kasai S, Yamaoka S, Ohta N, Sawabe K, Iwanaga S, Isawa H. Determining vector competence of Aedes aegypti from Ghana in transmitting dengue virus serotypes 1 and 2. *Parasites & vectors* 14(1):228-228 2021.

2. 和文発表

- 1) 齊藤慎二, 鈴木康司, 小谷 治, 相内 章. インフルエンザの抗 HA ステム抗体とユニバーサルワクチン. 生体の科学. Vol. 72 No. 4. 2021.
- 2) 糸川健太郎, ターゲットリシーケンス技術による昆虫電位依存性ナトリウムチャンネル遺伝子の効率的解析 (特集 ポスト NGS の昆虫科学を考える)、蚕糸・昆虫バイオテック 90(1) 21-25 2021年4月

II. 学会発表

1. 国際学会

- 1) G. Kogure, M. Onuki, T. Iwata, K. Matsumoto, I. Kukimoto. Whole-genome analysis of possibly carcinogenic HPV67 isolated from Japanese women with cervical cancer/precancer. 34th International Papillomavirus Conference (2021年11月、トロント)

2. 国内学会

- 1) 日下部美佐子, 田口歩, 谷川道洋, 星大輔, 豊原佑典, 河田啓, 曾根献文, 柊元巖, 織田克利, 筆宝義隆, 大須賀謙, HPV18型陽性子宮頸部小細胞癌のオルガノイド樹立 オルガノイドが切り拓く希少癌個別化医療、第80回日本癌学会学術総会(2021年10月、横浜)

- 2) 小暮剛太、小貫麻美子、岩田卓、松本光司、柊元巖、日本人女性から分離された HPV67 の全ゲノム解析、第 80 回日本癌学会学術総会(2021 年 10 月、横浜)
- 3) 小谷燦璃古、柊元巖、野村弘行、川原莉奈、藤井多久磨、子宮頸がんを高発現する miRNA の検出法は補助診断として有効である、第 80 回日本癌学会学術総会(2021 年 10 月、横浜)
- 4) 若江亨祥、柊元巖、APOBEC3 はメルケル細胞ウイルスゲノムに変異を導入する、第 80 回日本癌学会学術総会(2021 年 10 月、横浜)
- 5) ネコ扁平上皮癌における猫パピローマウイルス 2 型 (FcpPV2) 検出率の日本と台湾の比較、芳賀猛、山下-川西奈那子、C. Y. Chang、J. K. Chambers、内田和幸、杉浦勝昭、柊元巖、H. W. Chang、第 164 回日本獣医学学会学術集会(2021 年 9 月、江別)
- 6) 石井克幸、山地俊之、本間悠太、関塚剛史、ゲノムワイド CRISPR スクリーニングによる HPV 細胞侵入に必要な宿主因子の同定、第 68 回日本ウイルス学会学術集会(2021 年 11 月、神戸)
- 7) Structure-guided creation of an anti-HA stalk antibody F11 derivative that neutralizes both F11-sensitive and -resistant influenza A (H1N1)pdm09 viruses. 小谷治、鈴木康司、齊藤慎二、相内章、上野朗、逸見拓矢、佐野芳、田畑耕史郎、横山勝、鈴木忠樹、長谷川秀樹、佐藤裕徳。第 68 回日本ウイルス学会学術集会(2021 年 11 月、神戸)
- 8) 横山勝、中山英美、小谷治、塩田達雄、佐藤裕徳。 Dengueウイルス Eタンパク質と 2 型特異的中和抗体の分子動力学計算による解析。第 68 回日本ウイルス学会学術集会(2021 年 11 月、神戸)
- 9) 村上努、小早川拓也、大西立人、朴清香、横山勝、小谷治、辻耕平、佐藤裕徳、玉村啓和。カプシド二量体化に関与する相互作用を標的とした新規抗 HIV-1 低分子化合物の作用機序解析および誘導体の創製。第 68 回日本ウイルス学会学術集会(2021 年 11 月、神戸)
- 10) 村上努、小早川拓也、大西立人、朴清香、横山勝、小谷治、辻耕平、佐藤裕徳、玉村啓和。カプシド二量体化を標的とした新規抗 HIV-1 低分子化合物の作用機序解析および誘導体の合成。第 35 回日本エイズ学会学術集会・総会(2021 年 11 月、東京)
- 11) 横山勝、小谷治、佐藤裕徳。 GaMD シミュレーションにより明らかにした HIV-1 エンベロープタンパク質三量体の構造ダイナミクス。第 44 回日本分子生物学学会年会(2021 年 12 月、横浜)
- 12) 齊藤慎二、小谷治、鈴木康司、相内章、上野朗、逸見拓矢、佐野芳、田畑耕史郎、横山勝、鈴木忠樹、長谷川秀樹、佐藤裕徳。 経鼻不活化インフルエンザワクチンにより誘導された抗 H A-stalk 抗体の構造情報に基づいた機能予測と中和能の改変。第 25 回日本ワクチン学会(2021 年 12 月、軽井沢)
- 13) 黒田誠。新型コロナウイルス SARS-CoV-2 ゲノム情報による分子疫学解析～ Variants of concern の特徴 ～ 第 95 回日本感染症学会学術講演会/第 69 回日本化学療法学会総会 合同学会緊急シンポジウム (オンライン開催、2021 年 5 月)
- 14) 吉田志緒美、関塚剛史、黒田誠、露口一成、井上義一、鈴木克洋。肺抗酸菌症由来臨床検体のメタゲノムによるフローラ解析。第 127 回日本結核・非結核性抗酸菌症学会近畿支部学会 (2021 年 7 月)
- 15) 黒田誠。新型コロナウイルスのゲノム情報を活用したサーベイランスと公衆衛生対策。第 65 回日本医真菌学会総会 (2021 年 10 月 東京)
- 16) 黒田誠。新型コロナウイルスのゲノムサーベイランスと公衆衛生対策への利活用。第 68 回日本ウイルス学会学術集会 日本臨床ウイルス学会共催シンポジウム(2021 年 11 月 神戸市)
- 17) 黒田誠。新型コロナゲノム・サーベイランスから示唆される公衆衛生対策への利活用。第 80 回日本公衆衛生学会総会 (オンライン開催 2021 年 12 月)
- 18) 黒田誠。新型コロナウイルスのゲノムサーベイランスによる公衆衛生対策。福岡県”One Health”国際フォーラム 2022 (オンライン開催 2022 年 2 月)
- 19) 志多田千恵、関塚剛史、坂本智代美、黒田誠、高橋元秀。熊本県内土壌中の破傷風菌の分布調査と分離菌の細菌学的、遺伝子学的解析。第 95 回日本細菌学会総会 (オンライン開催、2022 年 3 月)
- 20) 橋野正紀、関塚剛史、糸川健太郎、黒田誠。 ESAT-6 like protein contributes to T7SS-dependent cytotoxicity in *Streptococcus intermedius*。第 95 回日本細菌学会総会 (オンライン開催、2022 年 3 月)
- 21) 糸川健太郎、前川芳秀、比嘉由紀子、小林大介、伊澤晴彦、関塚剛史、黒田誠、沢辺京子、葛西真治。ナミカ亜科用汎用的 SNP 解析プローブの開発。第 73 回 衛生動物学会大会(2021 年 4 月、鹿児島)